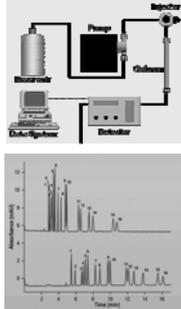


## INTRODUCCIÓN A LA HPLC



### FUNDAMENTOS DEL ANALISIS CROMATOGRÁFICO. Cromatografía Líquida de Alta Resolución



Dr. JOSÉ ANTONIO FERNÁNDEZ LÓPEZ  
Depto. Ingeniería Química  
Grupo de Investigación QUIMYTEC  
UPCT

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

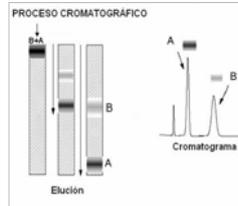
Cromatografía = *escribir en colores*

Elementos que participan en una cromatografía

1. Fase estacionaria
2. Fase móvil
3. Muestra

¿Cómo interactúan?

En general, una cromatografía se realiza permitiendo que la mezcla de moléculas que se desea separar (muestra) interactúe con un medio o matriz de soporte que se denomina fase estacionaria. Un segundo medio (la fase móvil) que es inmiscible con la fase estacionaria se hace fluir a través de ésta para "lavar" (eluir) a las moléculas en la muestra.



2

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

Inicialmente se refería a:

- High Pressure Liquid Chromatography

En la actualidad hace referencia a:

- High Performance Liquid Chromatography

La alta presión permite usar relleno de tamaño de partícula reducido para lograr la separación de componentes a flujos razonables.

3

---

---

---

---

---

---

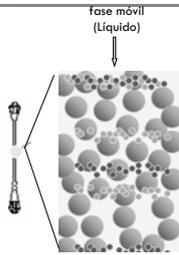
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

HPLC = high performance liquid chromatography  
↓  
cromatografía líquida de alta resolución

Otras acepciones equivalentes:  
high pressure liquid chromatography  
high patient liquid chromatography  
high priced liquid chromatography



bombas que permiten presiones de hasta 6000 psi (414 atm) hacen pasar la fase móvil por el interior de columnas de acero (2-5 mm x 3-25 cm) que contienen la fase estacionaria con flujos de 0,1 - 10 ml/min.

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

- **Las muestras no necesitan ser vaporizadas para su análisis. Cualquier sustancia puede ser potencialmente analizada por esta técnica.**
- **El desarrollo instrumental es posterior al de la CG debido a dificultades para lograr un flujo estable en el eluyente.**

5

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

- **Una muestra en estado líquido es arrastrada por una corriente líquida llamada eluyente.**
- **Como fase estacionaria actúa un sólido finamente dividido (diámetro de partícula 3, 5, 10  $\mu\text{m}$ ), o una película líquida a él adherida.**
- **Dependiendo de la retención de los componentes de la muestra por la fase estacionaria y de su solubilidad en el eluyente se provocará su migración diferencial.**

6

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### Características:

- Selectividad
- Reproducibilidad
- Sensibilidad
- Rapidez

### Parámetros:

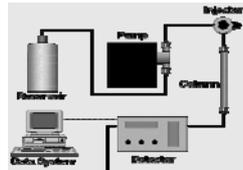
- Naturaleza de la fase estacionaria
- Tamaño de partícula
- Eluyente (composición y flujo)
- Detector

### Fase Directa:

fase estacionaria polar  
fase móvil de baja polaridad

### Fase Reversa:

fase estacionaria de polaridad baja  
fase móvil de polaridad alta



## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### ▪ Principales mecanismos de interacción en cromatografía líquida:

- Adsorción superficial
- Partición
- Intercambio iónico
- Exclusión molecular

8

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

La fase estacionaria es sólida. La separación se logra por las diferencias en solubilidad (en fase móvil) y de retención por adsorción (en fase estacionaria) de la mezcla de solutos.



9

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE ADSORCIÓN

- **Sílica (90%) y alúmina (10%) son las fases estacionarias más comunes.**
- **Tanto las moléculas de solutos como de disolvente son atraídas hacia los lugares activos polares de la fase estacionaria.**
- **Unos solutos serán más atraídos que otros por la fase estacionaria y así se logrará su migración diferencial.**
- **Se usan mezclas de disolventes para conseguir el poder de elución y la selectividad adecuadas. Normalmente un disolvente apolar (n-hexano) unido a otro más activo (acetona, cloruro de metilo, etc.).**

10

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

La separación se basa en el reparto o distribución de los solutos entre una fase móvil líquida y otra estacionaria inmisible, soportada sobre un sólido inerte. La discriminación se produce por diferencias de solubilidad.



11

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

- **El mecanismo de actuación es similar al de un modelo de extracción en contracorriente.**
- **Las especies más retenidas serán las que presenten mayor afinidad (solubilidad) por la fase estacionaria que por la fase móvil (eluyente).**
- **La separación de los solutos se basa en las diferencias en esta solubilidad relativa.**

12

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

▪ Existen dos modos básicos de operación:

- ☞ Fase normal. Cuando se trabaja con fase estacionaria polar y fase móvil no polar.
- ☞ Fase reversa. Cuando se emplea una fase estacionaria no polar y fase móvil polar.

▪ Inicialmente tuvo más auge la fase normal pero en la actualidad son más comunes los métodos cromatográficos en fase reversa dada la naturaleza hidrofílica de las muestras de mayor interés (clínico, contaminación, alimentos).

13

---

---

---

---

---

---

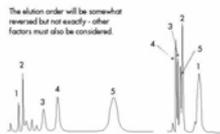
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

Según empleemos fase directa o fase reversa se nos va a alterar el orden de elución de bandas y el tiempo de análisis.



14

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE PARTICIÓN

Materiales comerciales empleados como soportes en cromatografía de adsorción y partición.

Tipo	Nombre comercial	Tamaño partícula (µm)	Area específica (m <sup>2</sup> /g)
Sílice	Hypersil	5-7	200
Sílice	Lichrospher 100	10	25
Sílice	µPartisil	5, 10, 20	400
Sílice	Spherosil	5, 10, 20	600
Alúmina	Spherisorb A5W	5	90

15

---

---

---

---

---

---

---

---



## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

- Se emplea para el análisis de todo tipo de iones (inorgánicos y orgánicos).
- Las moléculas intercambiadoras se ligan a soportes específicos.
- El material intercambiador de la fase estacionaria es de diámetro de partícula pequeño (1-10  $\mu\text{m}$ ) y estructura microporosa o pelicular con capacidad de cambio muy baja respecto al material intercambiador convencional ( $10^{-2} - 10^{-3}$  meq/g).

19

---

---

---

---

---

---

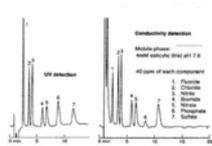
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO

Separación de aniones inorgánicos por cromatografía de intercambio iónico.



20

---

---

---

---

---

---

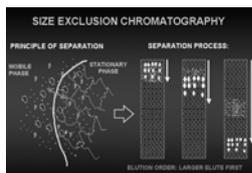
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

La separación se basa en el tamaño molecular. Como fase estacionaria se emplean sustancias de tamaño de poro determinado. También se denomina cromatografía de permeabilidad por gel (GPC).



21

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

- Como fase estacionaria se emplea un material poroso inerte (gel) que permite la discriminación entre los solutos según su tamaño.
- Los analitos de mayor tamaño no pueden penetrar en los poros de la fase estacionaria y son excluidos, viajando con la fase móvil en el frente de la misma.
- Se muestra especialmente útil para determinar el rango molecular de polímeros, proteínas, etc.

22

---

---

---

---

---

---

---

---

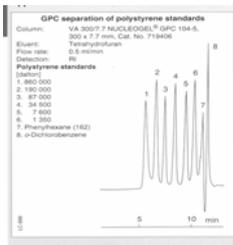
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

**Separación de polímeros de poliestireno por GPC.**



23

---

---

---

---

---

---

---

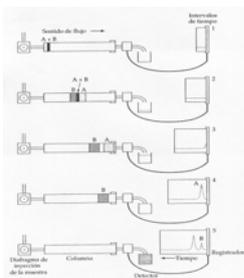
---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### EL EXPERIMENTO CROMATOGRÁFICO



**Ilustración de un experimento por HPLC.**

24

---

---

---

---

---

---

---

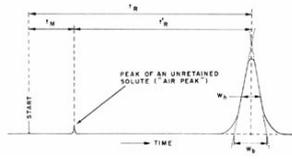
---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## EL EXPERIMENTO CROMATOGRÁFICO



Parámetros de un cromatograma.

25

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## MAGNITUDES CROMATOGRÁFICAS

MAGNITUD		SÍMBOLO
Tiempo de retención de una sustancia no retenida	seg.	$t_M$
Tiempo de retención	seg.	$t_R$
Tiempo de retención reducido	seg.	$t'_R = t_R - t_M$
Retención relativa	--	$\alpha = t_{R2} / t_{R1}$
Amplitud de bandas a media altura	seg.	$W$
Relación de capacidad	--	$k' = t_R / t_M$
Resolución	--	$R_S = 2 [(t_{R2} - t_{R1}) / (w_1 + w_2)]$

26

---

---

---

---

---

---

---

---

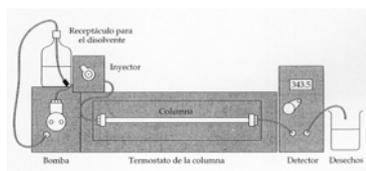
---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## EQUIPO

### Equipo básico para HPLC.



27

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### FASE MÓVIL

- Alta pureza (calidad HPLC).
- Inactividad frente a la fase estacionaria.
- Baja viscosidad.
- Compatibles con la muestra.
- Facilitar la recuperación de la muestra.
- Compatibilidad con el sistema de detección.
- Según su composición varíe o no con el tiempo:
  - ⇒ Elución isocrática
  - ⇒ Elución en gradiente

28

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### FASE MÓVIL

- Los disolventes deben desgasificarse antes de uso empleo en HPLC.
- La desgasificación reduce el riesgo de formación de burbujas en la columna o en el detector.
- Posibilidades:
  - ⇒ Desplazamiento con un gas menos soluble (He)
  - ⇒ Aplicación de vacío
  - ⇒ Sonicación
  - ⇒ Calentamiento

29

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### BOMBAS

- Presión estable hasta 5000 psi (400 atm) 1 atm = 14,696 psi
- Flujo libre de pulsaciones
- Amplio rango de flujos (0,1 a 10 mL/min)
- Control, exactitud y reproducibilidad del flujo
- Componentes químicamente inertes y resistentes a la corrosión



30

---

---

---

---

---

---

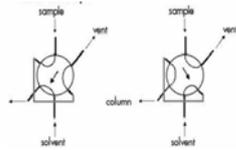
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### SISTEMAS DE INYECCIÓN

- Se emplean válvulas inyectoras de volumen (loop) constante
- Pueden ser manuales o automáticas
- Para variar el volumen de inyección se debe cambiar el "loop" correspondiente
- Se debe evitar la entrada de burbujas en el sistema de inyección



31

---

---

---

---

---

---

---

---

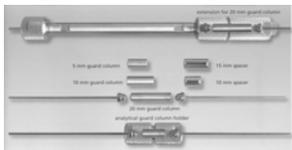
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### PRECOLUMNAS

- Se trata de una pequeña columna (0,5 – 3 cm) colocada entre el inyector y la columna
- Ayuda a prevenir la entrada de suciedad, procedente de la muestra o del eluyente, en la columna analítica
- Va a permitir alargar la duración de las columnas
- Debe ser del mismo relleno que el de la columna analítica



32

---

---

---

---

---

---

---

---

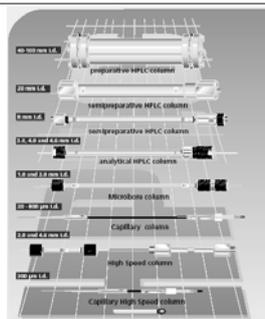
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### COLUMNAS

- Gran avance en la última década por el progreso en la tecnología de rellenos y columnas
- Rellenos más uniformes y de menor tamaño
- Fases químicamente ligadas a los soportes aumentando su eficacia y resolución
- Mejora en los métodos de empaquetado




---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## COLUMNAS

- Al disminuir el tamaño del relleno aumenta la eficiencia pero también la presión de trabajo
- Las columnas constan de:
  - Cuerpo – normalmente de acero inoxidable
  - Relleno – material con i.d. definido
- Algunas casas comerciales permiten la renovación del relleno sin tener que comprar la columna completa
- Existen columnas de compresión radial, cuyo cuerpo puede ser presurizado para aumentar su eficiencia



34

---

---

---

---

---

---

---

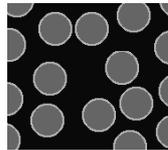
---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## COLUMNAS

### Fase Normal

- Sílica
- Alúmina
- Amino (-NH<sub>2</sub>)
- Ciano (-CN)
- Diol (glicidoxi-etilmetoxisilano)



### Fase Reversa

- C-2 o RP-2 (-SiCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)
- C-8 o RP-8 (-Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>7</sub>-CH<sub>3</sub>)
- C-18 o RP-18 (Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>)

35

---

---

---

---

---

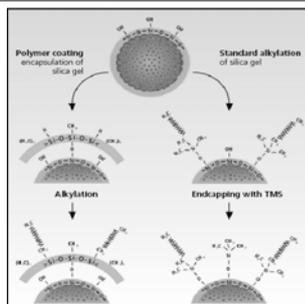
---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## COLUMNAS



36

---

---

---

---

---

---

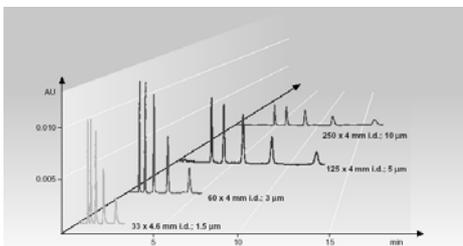
---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## COLUMNAS

Influencia de la longitud de la columna y del tamaño de partícula en la duración del cromatograma



---

---

---

---

---

---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## COLUMNAS

Ventajas de la "High Speed HPLC" con columnas cortas

- Tiempo de análisis reducido
- Menor consumo de disolventes
- Menor dispersión de los solutos a analizar
- Ahorro de costes
- Mayor sensibilidad

38

---

---

---

---

---

---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## DETECTORES

- Cualquier propiedad física o química que se pueda medir en la disolución podría usarse como método de detección
- Los detectores en HPLC no son destructivos
- Se pueden clasificar en:
  - Detectores que miden una propiedad de la fase móvil
  - Detectores que miden una propiedad de los solutos

Rapidez  
Reproducibilidad  
Sensibilidad  
Linealidad  
Estabilidad

39

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### DETECTOR

#### Principales detectores empleados en HPLC:

- UV/Vis
- Fotodiodos
- Índice de refracción
- Fluorescencia
- Conductividad
- Dispersión de luz
- Espectrometría de masas

40

---

---

---

---

---

---

---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### DETECTOR

#### Comparación de detectores usados en HPLC

Detector	Límite detección	Permite Gradiente
UV/VIS	0,1 - 1 ng	Sí
Índice de refracción	100 - 1000 ng	No
Dispersión de luz	0,1 - 1 ng	Sí
Fluorescencia	0,001 - 0,01 ng	Sí
Conductividad	0,5 - 1	No
Espectrometría de masas	0,1 - 1 ng	Sí

41

---

---

---

---

---

---

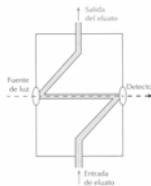
---

---

## INTRODUCCIÓN A LA HPLC

### DETECTOR UV/VIS

- Para sustancias que absorben radiación UV/VIS
- El más usado
- Con lámparas de deuterio, xenon o wolframio
- Desde 190 a 900 nm



Camino óptico de la microcelda de un detector UV/VIS. Las celdas ordinarias tienen 0,5 cm de camino óptico y contienen 8  $\mu$ L de líquido

---

---

---

---

---

---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## DETECTOR UV/VIS

### Longitudes de onda de corte en el UV de disolventes usados en HPLC

Disolvente	Longitud de onda
Acetona	330 nm
Acetonitrilo	190 nm
Agua	190 nm
Cloroformo	245 nm
Éter Dietílico	215 nm
n-Hexano	195 nm
Metanol	205 nm
Tetrahidrofurano	212 nm
Tolueno	284 nm

43

---

---

---

---

---

---

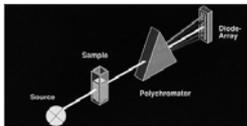
---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## DETECTOR FOTODIODOS

- Permite registrar la absorbancia simultánea en todo el rango UV/VIS.
- La muestra es atravesada por luz blanca (todas las  $\lambda$ ) y el policromador dispersa la luz en las diversas  $\lambda$  que la componen y las hace incidir a la fila de fotodiodos. En cada diodo incide una  $\lambda$  diferente, que manda la información al sistema de análisis de datos.



44

---

---

---

---

---

---

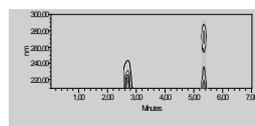
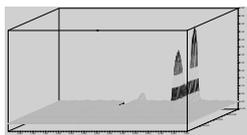
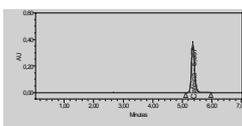
---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## DETECTOR FOTODIODOS

### Posibilidades de un detector de fotodiodos.



45

---

---

---

---

---

---

---

---

INTRODUCCIÓN A LA HPLC  
DETECTOR DE ÍNDICE DE REFRACCIÓN

- Van a medir variaciones en el índice de refracción del eluato con respecto al del disolvente puro.
- Sólo se pueden usar si la elución es isocrática.
- Responden casi todos los solutos pero con escasa baja sensibilidad.
- Son muy sensibles a las variaciones de temperatura. Deben estar termostatizados.

46

---

---

---

---

---

---

---

---

INTRODUCCIÓN A LA HPLC  
DETECTOR DE FLUORESCENCIA

- Para analitos fluorescentes por naturaleza o derivados fluorescentes.
- Se seleccionará la  $\lambda_{exc}$  y la  $\lambda_{em}$ .
- Son de alta sensibilidad.
- No se ven interferidos por los disolventes al no tener éstos naturaleza fluorescente.

47

---

---

---

---

---

---

---

---

INTRODUCCIÓN A LA HPLC  
DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD

- Son detectores basados en una respuesta diferencial y no absoluta.
- Empleados fundamentalmente en cromatografía de intercambio iónico.
- Inconvenientes:
  - Baja sensibilidad
  - Sensibles a impurezas de la fase móvil.

48

---

---

---

---

---

---

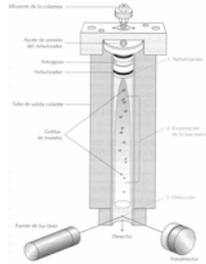
---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## DETECTOR DE DISPERSIÓN DE LUZ

- Válido para aquellos solutos que sean claramente menos volátiles que la fase móvil.
- El eluyente es evaporado con una corriente de N<sub>2</sub> dejando una nube de finas partículas sólidas que entran en la zona de detección.
- Las partículas se detectan por la luz que procede de un diodo láser y llega al fotodetector por dispersión.
- Sólo tampones volátiles en la fase móvil.




---

---

---

---

---

---

---

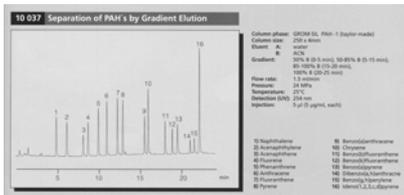
---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## APLICACIONES



50

---

---

---

---

---

---

---

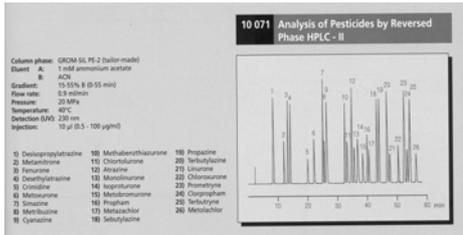
---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## APLICACIONES



51

---

---

---

---

---

---

---

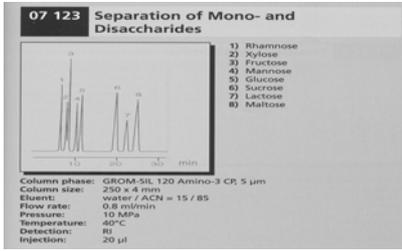
---

---

---

# INTRODUCCIÓN A LA HPLC

## APLICACIONES



52

---

---

---

---

---

---

---

---